

تشخیص کیفی پروتئینها و اسیدهای آمینه

انواع واکنشهای اسیدهای آمینه و پروتئینها را می توان به دو دسته واکنشهای رنگی و رسوبی تقسیم نمود. رسوب گیری توسط نمک، pI ، حلالهای آلی عوامل اسیدی، فلزات سنگین و حرارت از جمله واکنشهای رسوبی می باشند. آزمایشات نین هیدرین، میلون، زانتوپروتیک، هاپکینز-کول و ... از جمله واکنشهای رنگی محسوب می گردند.

دناتوراسیون پروتئینها:

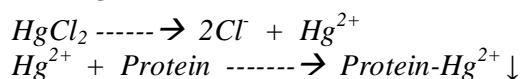
تغیر ماهیت یا تغییر در حالت طبیعی (*Native*) ساختمان پروتئین، دناتوراسیون (*Denaturation*) نامیده می شود. این دگرگونی در ساختمان دوم، سوم و چهارم پروتئین رخ می دهد. دناتوراسیون ممکن است برگشت پذیر (*Reversible*) یا برگشت ناپذیر (*Irreversible*) باشد. عوامل دناتوره کننده به دو دسته قابل تقسیم اند: عوامل شیمیایی (مانند: اسیدها، بازها، فلزات سنگین، اوره ...) و عوامل فیزیکی (مانند: حرارت، اشعه UV و اشعه X و ...) با استفاده از هریک از این عوامل می توان حضور پروتئینها در یک محلول را (بوسیله تشکیل رسوب) تشخیص داد:

رسوب گیری به وسیله حرارت:

حرارت باعث دناتوره شدن پروتئین و تغییر ساختار دوم سوم پروتئین و در نتیجه رسوب آن می گردد.

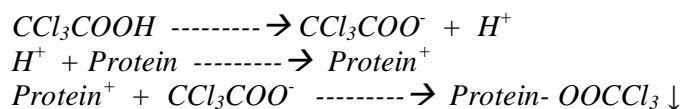
رسوب گیری به وسیله یون فلزات سنگین:

پروتئینها با یون فلزات سنگین (مانند: جیوه، سرب، نقره) ترکیب می شوند و نمکهای نامحلول تولید می نماید. از این خاصیت برای خارج کردن پروتئینها از محلول (*Deproteinizing*) استفاده می گردد. بر همین اساس شیر یا سفیده تخم مرغ به بیماری که با فلزی مانند یون جیوه (Hg^{2+}) مسموم شده باشد خورانده می شود. کازئین شیر در معده بیمار با جیوه ترکیب شده و راسب می گردد.



راسب شدن پروتئین بوسیله اسیدها:

پروتئینها پلی الکترولیتها آمفوتر می باشند. بنابراین تغییرات pH بر اتصال نمکی آنها که موجب استحکام ساختمان سوم آنها می گردد اثر می گذارد. بعضی از اسیدها مانند: اسیدتری کلرواستیک (TCA)، اسیدتنگستیک و اسیدسولفوسالسیلیک (SSA) با غلظت متوسط موجب دناتوره شدن و رسوب پروتئین می گردند. از این رو برای خارج کردن پروتئین (*Deproteinizing*) از مایعات بیولوژیکی می توان این اسیدها را بکار برد. مثلا پروتئینها به وسیله این اسیدها رسوب داده می شوند و مایعات فاقد پروتئین تهیه می گردد (*Protein-free fluids*):



رسوب گیری توسط حلالهای آلی مانند الکل و استون:

قابلیت حل پروتئینها در محلولهای مائی به واکنش هیدروفیلیک (*Hydrophylic*) بین مولکولهای قطبی آب و گروههای یونیزه شده موجود در مولکول پروتئین بستگی دارد. عواملی که ثابت دی الکتریک (D) محلول مائی را تغییر دهد در حلالیت پروتئین در محلول مائی اثر می گذارد. مثلا اضافه کردن اتانل یا استون سرد به محلولهای پروتئین موجب راسب شدن پروتئین می گردد. در درجه حرارتهای پائین حلالهای آلی پروتئین را رسوب می دهند. تحت این شرایط فعالیت حیاتی پروتئین نسبتا حفظ می گردد (*Reversible denaturation*). از این روش برای جدا کردن و خالص کردن پروتئینها استفاده می گردد. زیرا با اضافه کردن مرحله به مرحله حلال آلی (مثل استون) به محلول پروتئین، پروتئینهای مختلف در مراحل مختلف رسوب می نمایند. علت رسوب کردن پروتئین این است که در اثر اضافه کردن حلال آلی ثابت دی الکتریک آب پایین می آید و نیروی جاذبه (*Attractive force*) بین مولکولهای پروتئین بیشتر از نیروی جاذبه پروتئین و آب شده در نتیجه رسوب می نمایند.

مختلف

$$F = \frac{e_1 e_2}{Dr^2}$$

F = نیروی جاذبه بین دو یون با بارهای

e_1, e_2 = بار یونهای مثبت و منفی

r = فاصله بین آنها

D = ثابت دی الکتریک

رسوب دادن پروتئین ها بوسیله نمک (Salting out):

وجود یونهای مختلف در محلول پروتئینی، در حلالیت پروتئین اثر دارد. غلظت نمک تاثیر عمده‌ای بر روی حلالیت پروتئینهای موجود دارد. برای مثال اغلب پروتئینها در آب خالص نامحلولند. در صورتی که اضافه نمودن مقدار اندکی نمک باعث حلالیت آنها می‌گردد. این اثر بخاطر کنش متقابل بین یونهای نمک و بعضی از گروههای باردار پروتئین می‌باشد. در صورتی که یونهای نمکی در محلول موجود نباشند این گونه گروههای باردار پروتئینی با یکدیگر واکنش کرده و باعث عدم حلالیت پروتئین می‌گردند. حتی حلالیت پروتئینهایی که در آب مقطر نیز محلول می‌باشند را می‌توان با اضافه نمودن اندکی نمک تا مقادیر قابل توجهی افزایش داد. این پدیده حل کردن با نمک (Salting in) نامیده می‌شود. اگر غلظت نمک را در یک محلول پروتئینی به تدریج افزایش دهیم، نهایتاً به نقطه‌ای خواهیم رسید که در آن مقداری از پروتئینها شروع به رسوب می‌نمایند و اگر اضافه نمودن نمک را ادامه دهیم مقدار بیشتری از پروتئینها رسوب خواهند کرد. این پدیده رسوب دادن با نمک (Salting out) نامیده می‌شود. دلیل رسوب کردن پروتئینها این است که لایه‌هایی از ملکولهای آب که لازم است در اطراف یونهای نمک تشکیل گردد، ملکولهای آبی که برای هیدراته کردن بعضی از بارهای سطحی پروتئین مورد نیاز می‌باشد را گرفته و بنابراین کنش متقابل پروتئین با پروتئین، افزون بر کنش متقابل پروتئین و حلال می‌گردد و در نتیجه پروتئین شروع به رسوب کردن می‌نماید.

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$$

I = قدرت یونی نمک

C_i = غلظت اجزای یونی بر حسب مولار

Z_i = بار الکتریکی یونها

نکته: در یک مولاریته معین، قدرت یونی (Ionic strength) املاح دوظرفیتی بیشتر از یک ظرفیتی است. با توجه به رابطه بالا، هرچقدر غلظت نمک بیشتر شود قابلیت حل پروتئین در محلول بدلیل افزایش قدرت یونی، کمتر می‌گردد.

رسوب‌گیری پروتئینها در pH ایزوالکتریک (pI):

از آنجایی که پروتئینها دارای تعداد زیادی گروههای یونیزه شونده هستند در pH بازی، گروههای بازی بدون بار الکتریکی می‌باشند، در حالی که گروههای اسیدی یونیزه شده، بار الکتریکی منفی خواهند داشت. بنابراین پروتئین دارای بار الکتریکی منفی می‌باشد. ولی در pH اسیدی، پروتئین دارای بار الکتریکی خالص مثبت می‌باشد. در pH حدواسط تعداد بارهای الکتریکی مثبت و منفی ملکول پروتئین مساوی خواهد بود و بنابراین بار الکتریکی خالص پروتئین صفر است (pI) و هر پروتئین نقطه ایزوالکتریک خاص خود را دارد که به نوع اسیدهای آمینه موجود در آن بستگی دارد. در نقطه ایزوالکتریک قابلیت حل پروتئین بسیار کم و نیروی دافعه بین ملکولهای پروتئین مجاور به حداقل رسیده، ملکولها یکدیگر را جذب کرده و پروتئین رسوب می‌نماید.